

Analisis Sekuensing Nucleotida pada Mutasi Gen MTHFR C677T pada Kondisi Premature Cardio Infarction

Muizzuddin^{1*}, Tinny Endang H.², I. Ketut Muliarta², Liliek Sulistyowati²,
Djangan Sargowo²

¹Program Studi Biomedik, Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

²Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui miokard infark prematur yang terjadi karena *homocystein* disebabkan oleh adanya mutasi gen C677T MTHFR. Sampel darah diambil dari pasien dengan keadaan *intermediate hyperhomocystein* sebanyak 14 orang; dua diantaranya *hyperhomocystein* obligat. Pengukuran DNA Total menggunakan spektrofotometer 260 nm dan 280 nm dan visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa. DNA mutan gen MTHFR diamplifikasi dengan PCR dan gen MTHFR (C677T) diisolasi menggunakan primer yang dirancang menggunakan *Fast PCR*. Gen mutan MTHFR (C677T) diamplifikasi dan visualisasi melalui *Automated Sequencer Analyzer* dengan pembandingan gen CBS exon 3, 7, dan 8 normal, serta data sekuens Gene Bank OMIM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa determinasi konstruksi primer untuk lokus mutasi C677T semakin mudah ditetapkan. Sehingga membuka peluang untuk menggali informasi baru mengenai protein patologis pada pasien miokard infark prematur. Molekul polipeptida yang ditemukan memiliki sekuens GRLQLRSGPGEAHPK *VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSR FHHHAAFL*G dengan berat molekul 1.6 kda. Pencandraan molekul tersebut dengan NOC memiliki motif *Glycosaminoglycan site* dan *N-Myristolation site*, diduga dapat mempercepat proses *atherosclerosis* dan *atherothrombosis*.

Kata kunci: Gen MTHFR C677t, homocystein, Premature Cardio Infarction

ABSTRACT

This research was aimed to assess the premature myocardial infarction which occurred because of the mutation of C677T MTHFR gene. Blood samples were taken from 14 patients with intermediate hyperhomocysteine; two of them are obligate *hyperhomocysteine*. DNA Total was assessed by spectrophotometer 260 nm and 280 nm and visualized by agarose gel electrophoresis. DNA mutation of MTHFR gene was amplified with PCR and MTHFR (C677T) gene isolated by designed primer from *Fast PCR*. Mutation Gene of MTHFR (C677T) was amplified and visualized by *Automated Sequencer Analyzer* compared to the gene of CBS exon 3, 7, and 8 normal, as well as sequence from Gene Bank NCBI, OMIM. The results showed that the primer construction for mutation locus of C677T is getting determined easier. Thus open the opportunity to explore new information of pathological protein on the patients of premature myocardial infarction. Polypeptide molecules which was found has GRLQLRSGPGEAHPK *VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSRFHHHAAFL*G sequence with molecular weight 1.6 kda. Molecular sensing with NOC has similar motif to Glycosaminoglycan site and N-Myristolation site, which assumed could accelerate the process of atherosclerosis and atherothrombosis.

Key words: Gen MTHFR C677t, homocysteine, Premature Cardio Infarction

PENDAHULUAN

Peningkatan level plasma asam amino *homocystein* telah teridentifikasi sebagai faktor resiko independen untuk *atherosclerosis*, termasuk di dalamnya *coronary artery disease*, *cerebrovascular disease*, *peripheral vascular disease* dan *venous thrombosis* [1-4]. Studi mengindikasikan bahwa 15%-30% pasien dengan prematur *occlusive vascular disease* memiliki konsentrasi plasma *homocystein* meningkat

secara moderat yakni di atas 15 mmol.L⁻¹. Plasma dengan konsentrasi *homocystein* 5-15 mmol.L⁻¹ termasuk kategori moderat *hyperhomocystein*, bila konsentrasi plasma mencapai lebih dari 30 - 100 mmol.L⁻¹ disebut sebagai intermediet *hyperhomocystein*, jika *homocystein* >100 mmol.L⁻¹ disebut sebagai obligat *hyperhomocystein* yang sebenarnya [3,5]. Keadaan moderat *hyperhomocystein* merupakan faktor resiko *atherosclerosis* dan *thrombosis* yang berakibat miokard infark. Kondisi dapat mencetus penyakit hipertensi yang merupakan salah satu faktor resiko terjadinya penyakit jantung koroner dan menyebabkan komplikasi

* Alamat korespondensi:

Muizzuddin

Alamat : Program Studi Biomedik Pascasarjana
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145

pada organ lain, seperti pada mata, ginjal dan otak, serta pencetus penyakit kanker [6].

Penyakit-penyakit tersebut disebabkan oleh berbagai proses *pathogenesis* yaitu *atherosclerosis*, *atherotrombosis*, proses *aging* dan *degenerative*, inflamasi dan infeksi serta defisiensi nutrisi [7]. Agen patologis penyebab penyakit terdiri dari *free radical*, *cholesterol*, *triglicerida*, oksidasi LDL, adanya *foam cell*, juga *homocystein* yang berlebih (*hiperhomocystein*) akibatnya vitamin *deficiency* dan mutasi genetik.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil *homocystein* pada miokard infark prematur di Rumah Sakit di Kota Malang. Penelitian ini sebagai pembuktian pola titik mutasi pada urutan basa pada gen MTHFR pada nomor 677 yakni C677T, yang menyebabkan terjadinya *hiperhomocysteinemia* (HHCys) pada penderita miokard infark *premature*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui miokard infark prematur yang terjadi karena *homocystein* disebabkan oleh adanya mutasi gen C677T MTHFR, ataukah karena malnutrisi seperti defisiensi vitamin yang berkaitan dengan metabolisme *homocystein*.

METODE PENELITIAN

Isolasi DNA Darah Total

Darah diambil dari pasien dengan keadaan *intermediate hyperhomocystein* sebanyak 14 penderita, dengan 2 kasus berstatus *hiperhomocystin* obligat. Darah sebanyak 10 ml dalam tabung vakum bersalut EDTA sebagai anti koagulan. Pengukuran konsentrasi DNA total dilakukan dengan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Visualisasi dengan gel agarosa yang di foto dengan kamera Polaroid DS-40. Disimpan Cairan DNA dalam suhu -20°C .

Visualisasi DNA Gel Agarosa Elektroforesis

Preparasi 1% agarosa dengan mencampur 0,2 gr ultra pure agarose dan 1 X TBE sebanyak 20 ml dalam flask. Masukkan dalam *microwave* sampai mendidih dan campuran merata, ambil dan letakan sampai kira-kira suhu mencapai $50-60^{\circ}\text{C}$. Tambahkan 10 mg/mL *ethidium broide* sebanyak 2 μl , campurkan dan tuangkan pada tempat gel. Pastikan tebal gel $\pm 3-5$ mm. Lepaskan sisir gel dan tambahkan *buffer* elektroforesis sampai menutup gel. Dilusi sampel DNA 10 X dengan 1 X TAE. Campur 5 μl sampel DNA yang telah diencer dengan 1,5 μl *loading buffer* dan masukan ke dalam sumuran menggunakan mikropipet.

Pasang elektroforesis pada voltase yang konstan yaitu 100 volt atau 50 volt.

Amplifikasi DNA Mutan Gen MTHFR

Amplifikasi DNA mutan gen MTHFR dilakukan dengan PCR, menggunakan mikro pipet ukuran 0,5-10 l dan 10-100 μl . Tabung *ependrof* untuk PCR volume 500 μl . Perangkat lengkap elektroforesis termasuk didalamnya cetak gel dan tanki *buffer* elektroda. DNTP, Taq polymerase, dan Primer DNA: Gen MTHFR.

Isolasi Gen MTHFR (C677T)

Pada sampel dengan kemurnian DNA > 1.5 dilakukan isolasi gen MTHFR untuk melihat titik mutasi C677T. Konstruksi rancangan primer menggunakan Fast PCR. Primer Invitrogen MTHFR F: GGG AGG CTT CAA CTA CGC AGT GG. Lokus Sekuens: 507-529. Primer Invitrogen MTHFR R: AGC CTC AAA GAA AAG CTG CGT G. Lokus Sekuens: 678-699. Sekuens Produk PCR: 507-699 = 193 bp.

Amplifikasi gen mutan MTHFR (C677T)

Denaturasi awal 94°C selama 5', 30 siklus dengan kondisi temperatur denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik. *Annealing* pada suhu 62.9°C selama 1 menit, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, ekstensi tambahan pada suhu 72°C selama 7 menit sebanyak 1 siklus, diakhiri dengan temperatur 4°C selama 30 detik.

Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR

Ambil dari tabung mikro berisi DNA gen hasil amplifikasi sebanyak 10 μl dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 1.5 l dalam masih dalam pipet diaduk secara inverse, kemudian masukan ke dalam sumur agarose gel 2% dan dielektroforesis dengan tegangan 40 volt selama 2 jam. Kemudian hasilnya divisualisasi dengan UV-transilluminator dan di foto dengan kamera Polaroid DS-40.

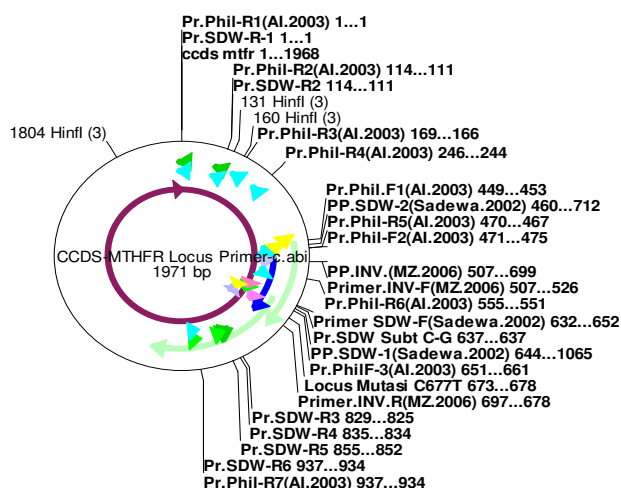
Pemurnian DNA isolat Gen CBS Exon 3, 7, dan 8, serta gen MTHFR, masing-masing mencapai 200 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Disekuens dengan *Automated Sequencer Analyzer*. Hasil sekuensing dianalisis dengan membandingkan dengan sekuens gen CBS *exon* 3, 7, dan 8 normal, serta gen MTHFR dengan menggunakan data sekuens Gene Bank NCBI Tahun 2005, OMIM database. Untuk mengetahui posisi mutasi gen CBS dan MTHFR.

HASIL PENELITIAN

Perancangan primer mengguna-kan *Fast PCR* tahun 2005 dan *ApEditor* tahun 2005, dengan menggunakan data *conserve region* gen *MTHFR* dari *Genebank* NCBI dengan kode akses 1.032 CCDS-MTHFR tahun 2005. Pemetaan *conserve region* gen *MTHFR* sebagai berikut. Band isolat DNA total dari pasien miokard infark prematur adalah sebagaimana gambar 1.1. Pemetaan posisi primer pada *conserve region* *MTHFR* pada Gambar 1.

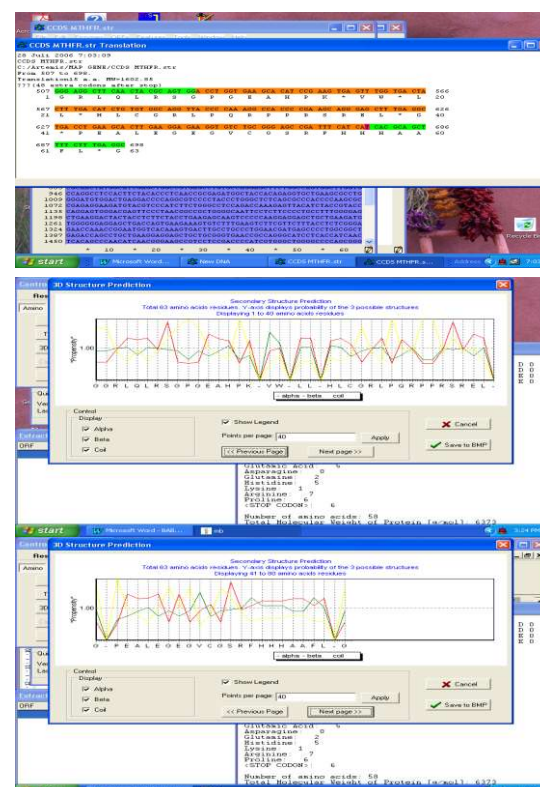
Hasil hibridisasi pada primer INV. *MTHFR* diperoleh bahwa primer *forward* *MTHFR-F* pada posisi 507..529 sedangkan posisi primer *reverse* pada posisi 678..699. Analisis sekuens dengan menggunakan *automated sequencer* dan menggunakan perangkat lunak *Artemis* versi 7 tahun 2005 dari *The Sanger Institute* diperoleh bahwa pada posisi titik mutasi C67T terjadi *miss reading frame* pada posisi 677.

Pemetaan posisi primer dapat melukiskan artefak metoda yang digunakan. Seperti yang telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya dimana rentang posisi sekuens nukleotida yang besar dipotong dengan enzim *HinfI* [8,9] (Gambar 1). Pemetaan gen ini dilakukan dengan input data informasi yang terdapat pada *Genbank* NCBI tahun 2005 tentang *Consensus Conserve DNA Sequence* (CCDS) gen *MTHFR*. Kesesuaian primer dengan *conserve region* *MTHFR* masing-masing 100, yang menunjukkan kualitas primer yang sesuai untuk membidik fragmen sekuens DNA pada *conserve region* gen *MTHFR*.



Gambar 1. Pemetaan gen *MTHFR* pada *conserve region* dengan rentang basa nukleotida sebesar 1971 bp. Posisi mutasi C677T berwarna merah, dibidik dengan primer INV *MTHFR* warna biru.

Hasil yang sama diperoleh dari visualisasi pemetaan gen *MTHFR* C677T pada *conserve region* digambarkan dengan *ApEditor*. komposisi Polipeptida hasil translasi teridentifikasi pada fragmen 507..699, sekuens asam amino yakni, GRLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPRSEL *G*PEALEGEGVCGSRFHHAFL*G (warna hijau pada Gambar 2.). Molekul ini diduga sebagai agen pada proses percepatan terjadinya *atherosclerosis* dan *atherotrombosis*.



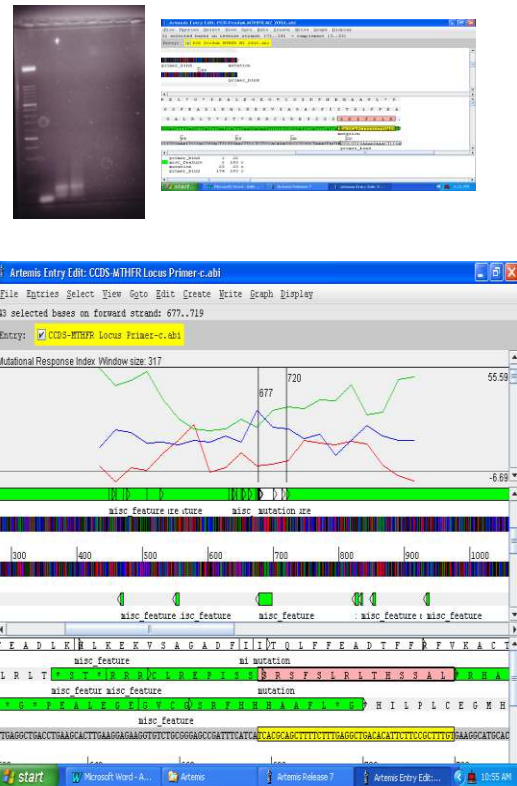
Gambar 2. Sekuens DNA pada Lokus 507..701. Terdapat penultimatebase mutasi C677T dengan warna merah. Primer Sadewa berwarna orange sedangkan primer invitrogen berwarna hijau. Pada bagian bawah sekuens DNA terdapat polipeptida hasil translasi yang merupakan molekul patologis secara ruang 3D.

Analisis hibridisasi pada Gambar 3 menunjukkan posisi primer pada *conserve region* CCDS *MTHFR*. Pada primer Phillipe yang digunakan mengemukakan bahwa rentang PCR *product* sebesar 1186 bp dan tidak membidik lokus C677T. Kualitas primer agar sesuai dengan *conserve region* bernilai kurang dari 100 sehingga banyak nukleotida yang tidak sesuai dengan pasangan pada *conserve region*. Kondisi ini dapat mengakibatkan tingkat kesulitan untuk dilakukan isolasi gen mutan *MTHFR* C677T.

Pada penelitian Sadewa [9], yang menyatakan bahwa *conserve region* gen MTHFR dalam posisi *reverse* sehingga primer yang digunakan menjadi target sekuens dengan warna biru (Gambar 3). Nilai skor kesesuaian (*matching*) kurang dari 100 pada posisi 460..712 sekitar 253 bp dimana di dalamnya terdapat penultimate *base* mutasi C677T. Jangkauan primer ini dengan nilai skor sebagaimana pada Gambar 3 menjangkau hampir seluruh *conserve region* (Gambar 1), sehingga diperoleh PCR produk dengan rentang yang cukup besar dan mendapatkan sekuens pada lokus 460..712. Pada penelitian tahun 2006 menggunakan primer produksi *Invitrogen* dengan sekuens AGC CTC AAA GAA AAG CTG CGT G, tampak bahwa pada lokus 507..526 nilai kesesuaian (*matching*) 100 dan pada lokus 678..699 dengan nilai yang sama. Hasil PCR diperoleh panjang sekuens sebesar 193 bp yang menjangkau penultimate *base* mutan C677T.

Lokus 507..699 adalah fragmen sekuens DNA dari *conserve region* CCDS-MTHFR. Sekuens DNA posisi 507..699 dapat dilakukan translasi dengan menggunakan perangkat lunak komputer. Polipeptida translasi pada region ini dapat divisualisasi dengan menggunakan perangkat lunak molekul *modeling* untuk memprediksi struktur, bentuk, dan motif molekul yang diduga bersifat patologis. Sehingga eksperimen untuk pengkajian proteomik patologis dapat dirancang dan diarahkan pada target molekul. Penentuan posisi asam amino dalam bentuk *alpha helix* dan *betasheets*

ditentukan dengan menggunakan *Molecular Biology Software* [11] dengan sekuens pada (Gambar 3.).



Gambar 3. Band gel elektroforesis gen mutan MTHFR C677T pada lokus fragmen DNA 507..699 pada CCDS-MTHFR 2005. *Frame shift reading* pada posisi T 677 dengan peptida SRSDFSRLRLTHSSAL berwarna pink.

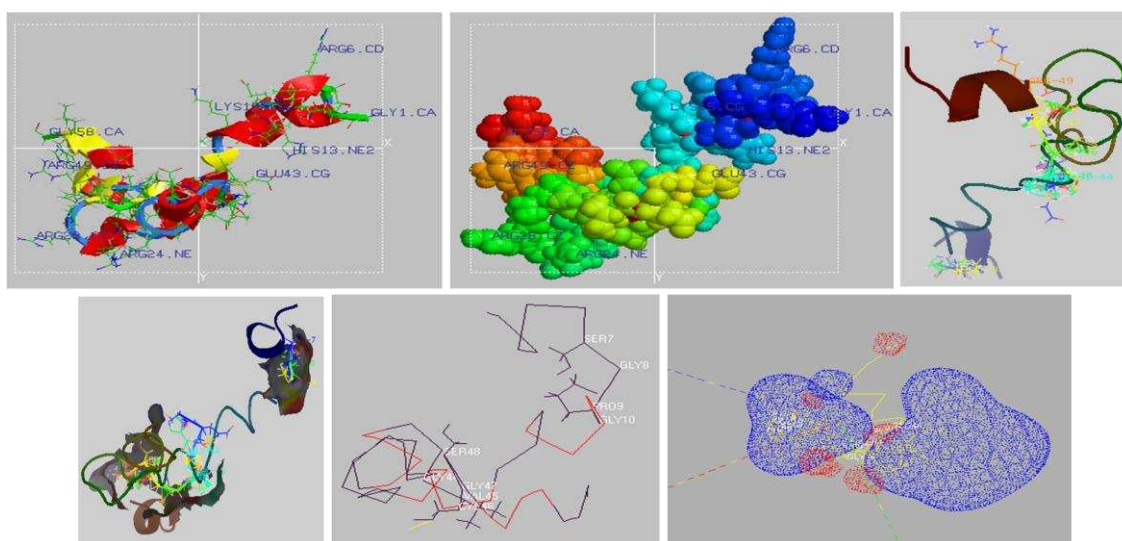
Possible motifs in the molecule MTHFR fragmen 507-699 (MZ 2006) by NOC motifs derived from SWISS PROSITE DATABASE
Chain A
7 to 10 SGPG in Red
motif: Glycosaminoglycan attachment site.
pattern: S-G-x-G.
44 to 49 GVCGR in Green
motif: N-myristoylation site.
pattern: G-EDRKHPFYW-x(2)-[STAGCN]-P.

PCR product from CCDS MTHFR NCBI 2005 (June 30, 2006 19:38)
Primer Phillippe MTHFR F_ (found oligo score: 79.58 sense: +
seg: TGAAGGGGAGAGGTGTCTGCGGA target: TGAAGGAGA-AGGTGTCTGCGGA)
position: 641 - 663
Primer Phillippe MTHFR R_ (found oligo score: 42 sense: -
seg: CACTCTACCGCACCGACCGTCCT target: AGGAGTCCCCGTCGCCGACCATCAT)
position: 1802 - 1826
PCR product: Length: 1186 bp. GC%: 57.84. Tm (50 mM Na+): 83.2 °C
PCR product from CCDS MTHFR NCBI 2005 (June 30, 2006 16:40)
Primer Sadewa MTHFR F_ (found oligo score: 46.5 sense: -
seg: TCCCGCAGACACCTCTTCA target: TGAGGCTGACACATTCCTCC)
position: 693 - 712
Primer Sadewa MTHFR R_ (found oligo score: 47 sense: +

Gambar 4. Perbandingan oligonukleotida primer dengan analisis sekuens AnnHyb 2005 untuk determinasi posisi oligonukleotida dalam *conserve region* gen MTHFR

Pada visualisasi struktur dilakukan dengan menggunakan *software Rastop*, *PyMol*, dan *SPDV Deepview 3.1 Swiss-prosite*. Motif molekul berada pada peptida SGP sebagai *Glycosaminoglycan site*, dan GVCGR sebagai *N-Myristoylation site*. Pembacaan motif peptida

menggunakan NOC 2005 (Gambar 4 dan 5). Hasil penelitian ini dapat dijadikan kandidat marker untuk penyakit mutasi genetik MTHFR C677T, dengan *allele* mutan *heterozygote* CT dan *homozygote* TT yang menyebabkan *hiper-homocysteinemia* dan *hiperhomocysteinuria*.



Gambar 5. Visualisasi molekul polipeptida translasi dari sekuens DNA pada lokus 507..699. *Conserve region* CCDS-MTHFR sekuens: RLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEG VCGSRFHHAFL*G, dengan *Rastop* 2005, *pyMol* 2005 dan *SPDV* 3.1 2004 sebagai potensial elektrostatis tampak pada warna biru.

KESIMPULAN

Data/informasi NCBI *Genebank conserve region* CCDS-MTHFR dapat digunakan untuk diagnostik penyakit mutasi genetik MTHFR C677T pada miokard infark prematur. Sekuens GRLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSRFHHAFL*G berat molekul 1.6 kda. Pencandraan molekul tersebut dengan NOC memiliki motif *Glycosaminoglycan site* dan *N-Myristolation site*, diduga dapat mempercepat proses *atherosclerosis* dan *atherothrombosis*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Harpel, P.C., X. Zhang, dan W. Borth. 1996. Homocysteine and Hemostasis: Pathogenic mechanisms predisposing to Thrombosis. *J. Nutr.* 126 (4): 1285-1289.
- [2] Fallst-Strobl, P. C., D. D. Koch, J. H. Stein, dan P. E. McBride. 1997. Homocysteine: a new risk factor for Atherosclerosis. *Am. Fam. Physician.* 56 (6): 1-8.
- [3] Stefanović, V. 2000. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for cardiovascular disease. *Facta Universitatis. Med. Biol.* 7(1): 7-10.
- [4] D'Angelo, A., A. Coppola, P. Madonna, I. Fermo, A. Pagano, G. Mazzola, L. Galli, dan A. M. Cerbone. 2000. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thromb. Haemost.* 83 (4): 563-570.
- [5] Gaustadnes, M., B. Wilcken, J. Oliveriusova, J. McGill, J. Fletcher, J. P. Kraus, dan D. E. Wilcken. 2002. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment. *Hum. Mutat.* 20: 117-126.
- [6] McCully, K. S. dalam Carmel, R. dan D. W. Jacobsen. 2001. Homocysteine in health and disease. Cambridge University Press. USA.
- [7] Selhub J, dan A. D'Angelo. 1997. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thromb. Haemost.* 78: 527-531.
- [8] Dilley, A., W.C. Hooper, M. El-Jamil, M. Renshaw, N.K. Wenger, dan B.L. Evatt. 2001. Mutations in the Genes Regulating Methylenetetrahydrofolate Reductase MTHFR→T677 and Cystathionine β-Synthase (CBS G→A919A, CBS T→c833) Are Not Associated with Myocardial Infarction in African Americans. *Thromb. Res.* 103 (2): 109-115.
- [9] Sadewa H.A., Y. Miyabe, H. Nishio, C. Hayashi, R. Sutomo, M. J. Lee, H. Ayaki, N. Koizumi, dan K. Sumino. 2002. No relationship exists between itai-itai disease and TA repeat polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene. *Arch. Toxicol.* 76 (8): 467-469.
- [10] Simakov, O. 2005. MB DNA Analysis Program. Molbiosoft. German. Available: <http://www.molbiosoft.de/>.